

末梢神経の変性および再生過程における Schwann 細胞と Macrophage の役割について

森定 ゆみ

前回、筆者は末梢神経の変性および再生過程における Schwann 細胞の NGFR 発現を免疫組織化学的に検索することにより、Waller 変性における Schwann 細胞の積極的役割を示唆した。今回、免疫組織化学的にラット monocyte/macrophage に対する抗体、ED-1を用いて、Schwann 細胞と macrophage の役割を明らかにした。

前回報告した通り、ラット坐骨神経に切断障害、または圧迫挫減障害を加えると2日目から Schwann 細胞は単独で既存の髄鞘の消化、吸収を開始した。5日目 macrophage が ED-1により免疫組織化学的に同定された。その後、ときほぐし標本で崩壊しつつある神経線維に付着または侵入した ED-1陽性細胞が認められ、電顕的にも Schwann 細胞が基底膜の外へ放出した髄鞘の崩壊産物を取り囲む macrophage が観察された。macrophage は Schwann 細胞が消化しきれなかった髄鞘の崩壊産物の吸収、除去に参与していた。

軸索再生の Waller 変性に及ぼす影響を検索するために切断障害と圧迫挫減障害で出現した髄鞘の崩壊産物の量と macrophage の数を比較した。圧迫挫減障害では5日目から障害の近位部で軸索再生が観察されたが、同部では髄鞘の崩壊産物の量も免疫組織化学的に同定される macrophage の数も切断障害の近位部、遠位部、圧迫挫減障害の遠位部に比べて少なかった。再生軸索が存在すると、存在しない場合に比較して Schwann 細胞の中で既存の髄鞘の消化、吸収能力が亢進することが示唆された。

Waller 変性が速やかに進行し、軸索再生を可能にするには再生軸索、Schwann 細胞、macrophage 間にサイトカインなどの因子を介して情報交換が行われていると推定された。

(平成5年10月23日採用)

The Role of Schwann Cells and Macrophages in the Rat Sciatic Nerve after Axotomy

Yumi Morisada

In the peripheral nerves, rapid progression of Wallerian degeneration has been thought to be an important element in providing a favorable environment for axonal regeneration. A previous study disclosed that absorption of degenerated axons or digestion of myelin by the Schwann cells caused them to express low affinity nerve growth factor receptors in Wallerian degeneration after axotomy. We found that Schwann cells played important roles in Wallerian degeneration. The purpose of

this study was to clarify the role of Schwann cells and macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration by immunohistochemical and electron-microscopic techniques.

At two days after axotomy, Schwann cells began to digest old myelin. At five days after axotomy, immunohistochemically ED-1 (a monoclonal antibody directed against rat monocytes/macrophages) positive cells appeared in the part distal to the injury. After that, electron-microscopically some cells were seen to enclose myelin debris in the endoneurium which Schwann cells released to the outside of their basement membrane. We considered that the macrophages digested the myelin debris that Schwann cells could not digest smoothly.

At five days after crushing, regenerating axons reached the portion distally near to the crush injury. The amount of myelin debris and the number of macrophages in this portion were less than in the portion distally far from the crush injury or in the portion distal to the transection injury. It was suggested that axonal regeneration increases the removal capacity of myelin debris in the Schwann cells.

In Wallerian degeneration of the peripheral nerves, regenerating axons, Schwann cells and macrophages play their roles by exchanging information. (Accepted on October 23, 1993) *Kawasaki Igakkaishi* 19(4): 299-310, 1993

Key Words ① Peripheral nerves ② Wallerian degeneration
③ Axonal regeneration ④ Schwann cells
⑤ Macrophages

はじめに

末梢神経系は中枢神経系と比較して再生能力に富むことが知られている。近年、成長因子を含む各種のサイトカインが知られるようになり、Waller 変性における Schwann 細胞や macrophage の果たす役割に、再び関心が集まっている。前回、ラットの坐骨神経の変性および再生過程における低親和性神経成長因子受容体 (low affinity nerve growth factor receptor; NGFR) の発現を検討した際、Schwann 細胞が単独で既存の髄鞘の消化、吸収を開始することが明らかとなり、Schwann 細胞の Waller 変性における積極的役割が注目された¹⁾。今回、同様の過程において電顕的ならびに免疫組織化学的に macrophage を同定することにより、Waller 変性における Schwann 細胞と macrophage の役割について検討を加えた。

方 法

前回の報告¹⁾と同様、Sprague-Dawley ラットの雄、8 週齢 (体重 220-280 g) をペントバルビタール (35-40 mg/100 g 体重) 麻酔し、右坐骨神経を M. obturator internus の腱の位置で切断および圧迫挫滅障害を加えた。

切断障害は同部位を眼科用剪刀で切断し、切断部の中枢端を折り返し、神経線維束の連続性を断って、軸索の再生を阻止した。圧迫挫滅障害は、同部に幅 1 mm の摂子で圧迫挫滅障害を加え、神経線維は切断し神経周膜の連続性を残すことにより中枢部から軸索再生が可能となるようにした。左坐骨神経はコントロールとした。

障害を加えたのち、1, 2, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 28 日目に坐骨神経を灌流固定し摘出した。障害部より 1 cm 間隔で近位部、中間部、遠位部とし、近位部、遠位部で横断切片を、中間部でときほぐし標本を作成した。

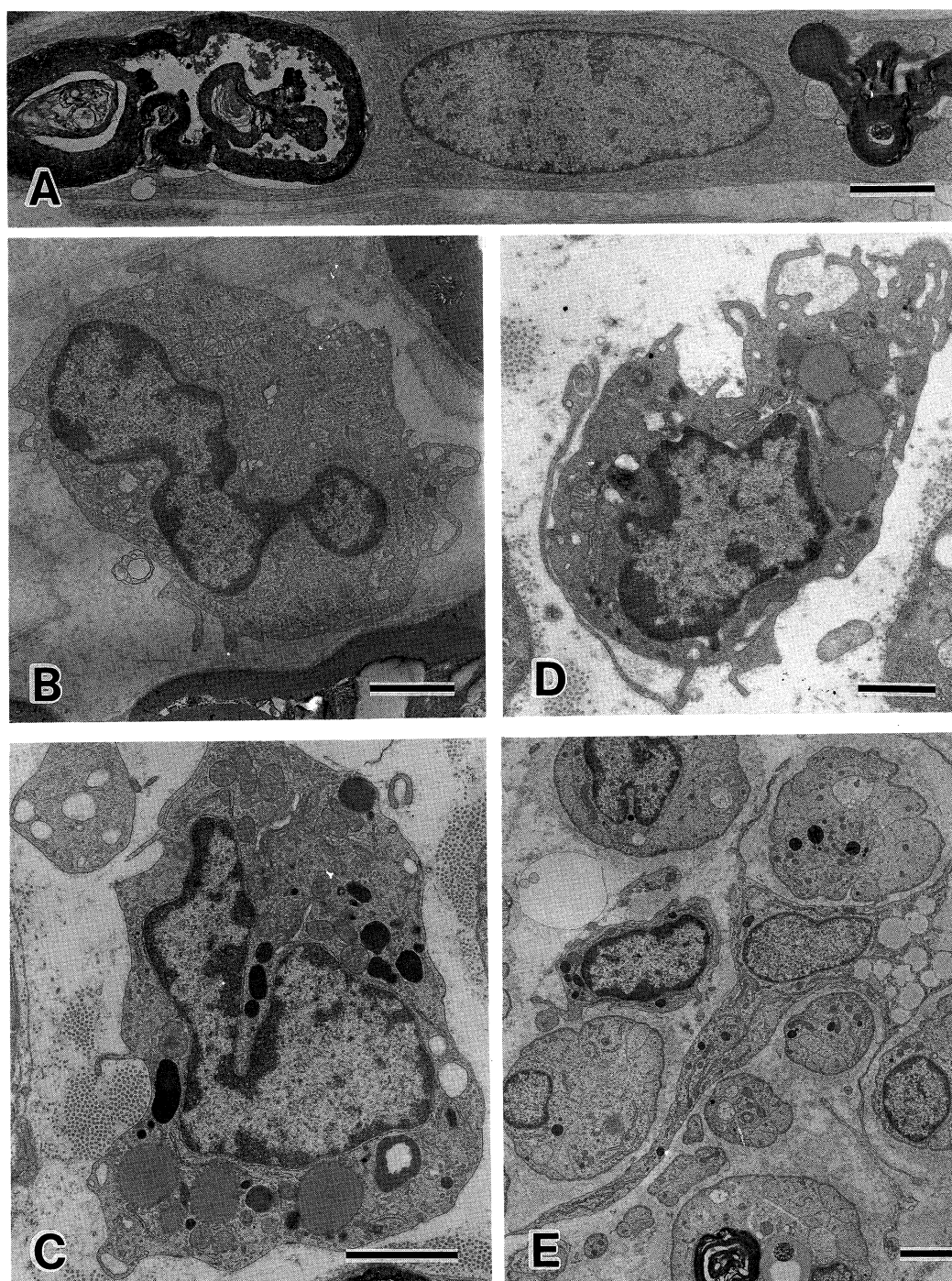
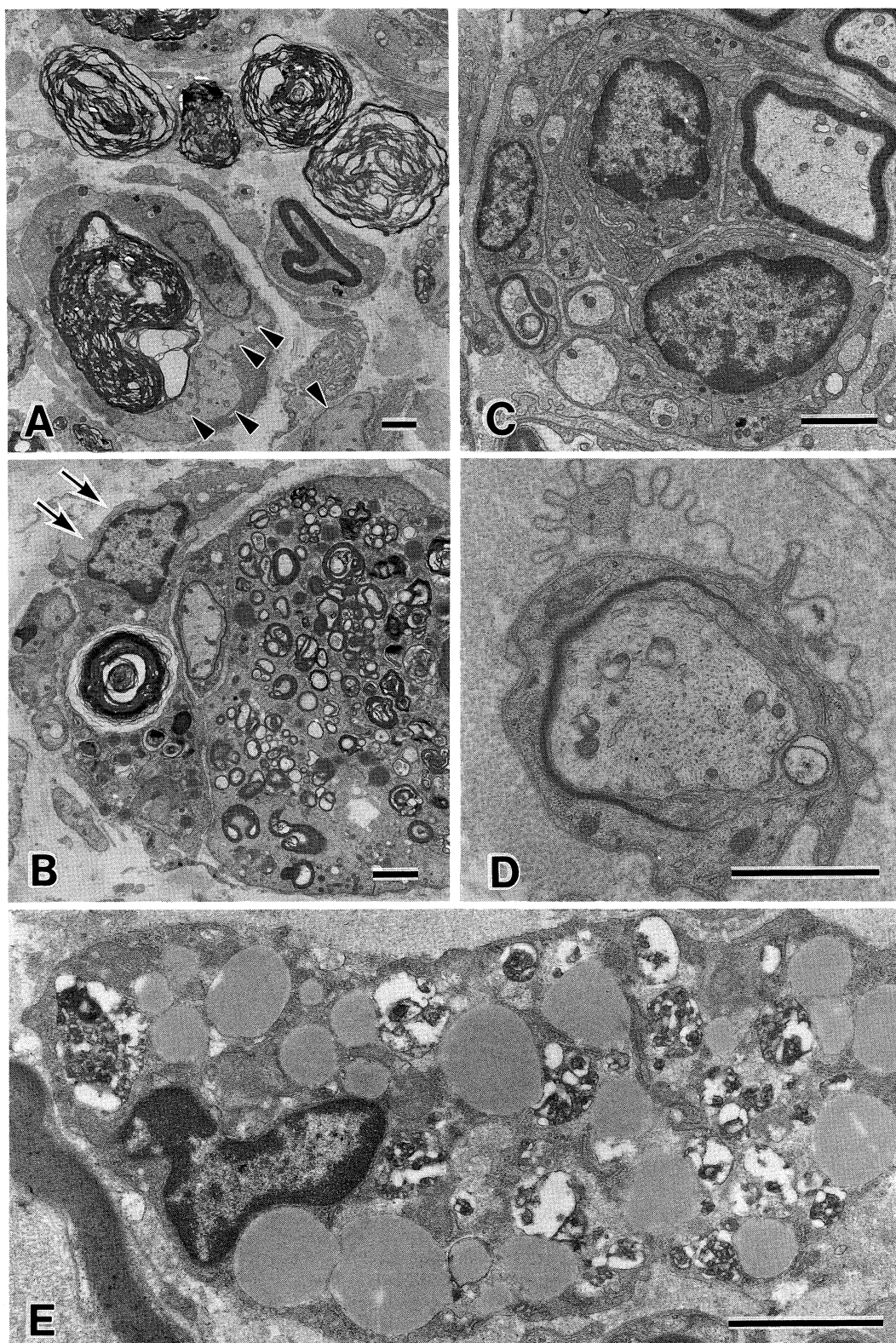


Fig. 1. Ultrastructures of the distal sciatic nerves after transection. **A.** Longitudinal section. At two days, Schwann cells digest old myelin in their cytoplasm. Bar 2 μ m. **B.** At two days, there are some immature cells rich in mitochondria and free ribosomes in the endoneurium. Bar 2 μ m. **C.** At five days, some cells rich in lysosomes are seen which are compatible with monocytes. Bar 2 μ m. **D.** At 14 days, some cells rich in lipid have long processes. Bar 2 μ m. **E.** At 28 days, myelin debris is almost all absorbed. Fibroblasts elongate their processes. The Schwann cells have some round processes in the basement membrane. Bar 2 μ m.



光顕的観察には、坐骨神経を4%グルタルアルデヒドで灌流、浸漬固定後、2%四酸化オスミウムで後固定し、エタノール、プロピレンオキサイドで脱水、エポキシ樹脂に包埋し、1 μ m切片を1%トルイジンブルーで染色した。

電顕的観察には、光顕観察と同様の方法でエポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作成し、2%酢酸ウラニル・クエン酸鉛重染色を施し、JEM-2000 EX IIで観察した。

免疫組織化学的には、坐骨神経を2%パラホルムアルデヒドと0.03%グルタルアルデヒドの0.1Mリン酸緩衝液で灌流、浸漬固定後、ドライアイス・アセトンで凍結し、クリオスタットで4 μ m切片を作成した。この凍結標本をED-1(抗ラット monocyte/macrophage 抗体, Serotec), SMI 31(抗高リン酸化ニューロフィラメント抗体, Sternberger Monoclonal Inc)でAvidin-biotin peroxidase complex法により染色した。また、免疫染色によるときほぐし標本は、同様に灌流、浸漬固定後、粗くときほぐした坐骨神経で浮遊法によりED-1を染色し、4%グルタルアルデヒドで後固定後、エタノールで脱水し、鋭い針を用い、細かくときほぐした。

結 果

光顕および電顕所見

切断障害：前回報告¹⁾したように、1日目変化は乏しかった。2日目電顕的にほとんどの線維の軸索でニューロフィラメントを含む細胞骨格が不鮮明となった。同時に Schwann 細胞は既存の髄鞘をその胞体内で短縮させ始めた(Fig. 1A)。また、細い突起を持ち、遊離リボゾーム

やミトコンドリアに富む胞体と桿状の核を持つ未熟な細胞が認められた(Fig. 1B)。5日目髄鞘の層板解離が進行した。細い突起とelectron denseなライソゾームに富む胞体を持つ細胞がendoneuriumに認められた(Fig. 1C)。14日目胞体内に脂肪滴を含む細胞が出現した(Fig. 1D)。28日崩壊髄鞘の大部分は吸収され、線維芽細胞が突起を伸展した(Fig. 1E)。切断障害では障害の近位部と遠位部で経過の差は明らかではなかった。

圧迫挫滅障害：2日目軸索の細胞骨格が崩壊し、3日目屈曲、解離した髄鞘を認め、この時点までは切断障害と同様の経過をたどった。5日目近位部で再生軸索が認められた(Fig. 2A矢頭)。同一基底膜の中に再生軸索を取り囲む Schwann 細胞と髄鞘を消化しつつある細胞が同時に存在していた。崩壊髄鞘の一部は基底膜の外に放出されていた(Fig. 2A)。9日目近位部では髄鞘再生と基底膜の外に放出された崩壊髄鞘を取り囲む細胞が認められた(Fig. 2B矢印)。遠位部にも再生軸索が一部到達した。14日目近位部では再生神経線維がclusterを形成しているのに対し(Fig. 2C)、遠位部では二重の基底膜に囲まれている神経線維が個々に散在していた(Fig. 2D)。以後、再生髄鞘は厚みを増していった。28日目胞体内のほとんどを脂肪滴が占める細胞が認められた(Fig. 2E)。

光顕的に、障害後5日目圧迫挫滅障害における近位部(Fig. 3B)は、層板解離し肥厚した崩壊髄鞘の量が、同障害の遠位部(Fig. 3C)、または切断障害(Fig. 3A)に比較して少ない傾向がみられた。この傾向は障害後14日目まで続いた。

← Fig. 2. Ultrastructures after crushing. A. At five days, some regenerating axons (arrow heads) have reached the Büngnar bundles in the portion distally near to the crush injury. Schwann cells release myelin debris out of their basement membrane. Bar 2 μ m. B. At nine days, the cells (arrows) have enclosed myelin debris released by Schwann cells out of the basement membrane. Bar 2 μ m. C. At 14 days, clusters of the regenerating axons are observed in the portion distally near to the crush injury. Bar 2 μ m. D. At 14 days, regenerating nerve fibers are scattered in the portion distally far from the crush injury. Bar 2 μ m. E. Lipid laden macrophage. Bar 2 μ m.

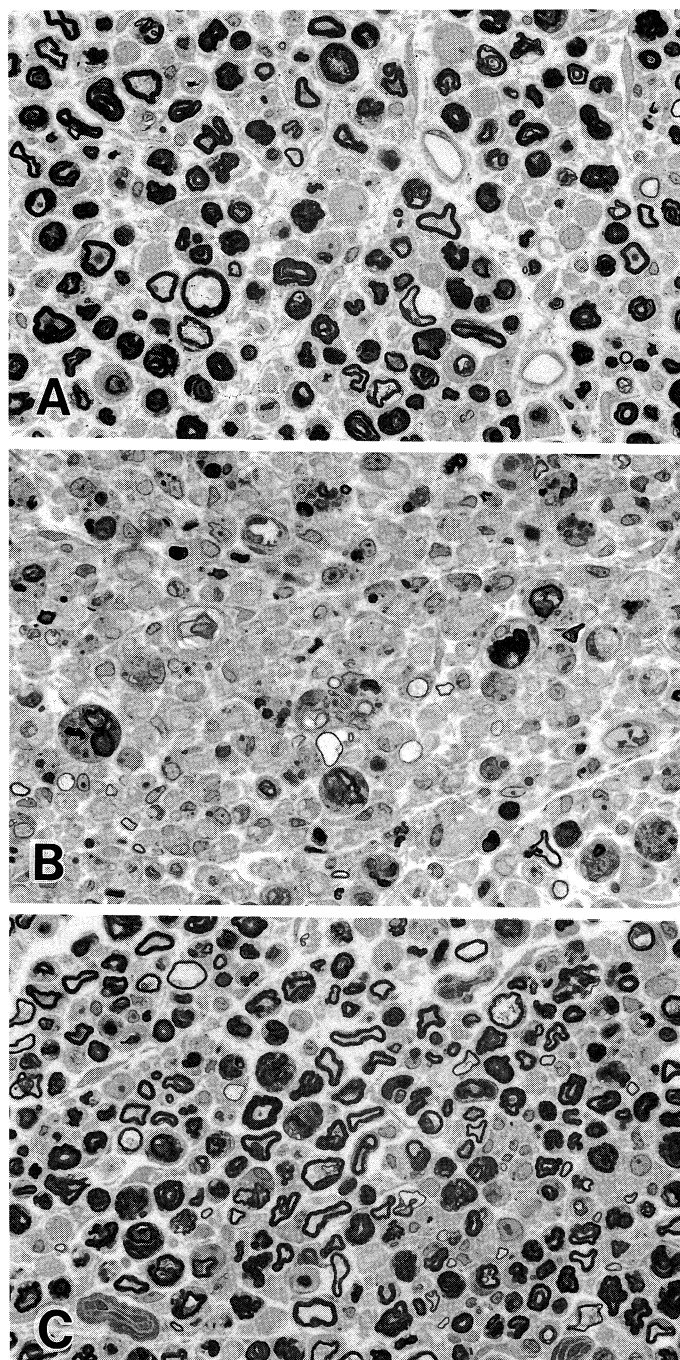


Fig. 3. Light micrographs at five days after axotomy.
A. The portion distal to the transection injury. $\times 170$.
B. The portion distally near to the crush injury. $\times 170$.
C. The portion distally far from the crush injury. $\times 170$.
There is less myelin debris in the portion distally near to the crush injury than in the other portions.

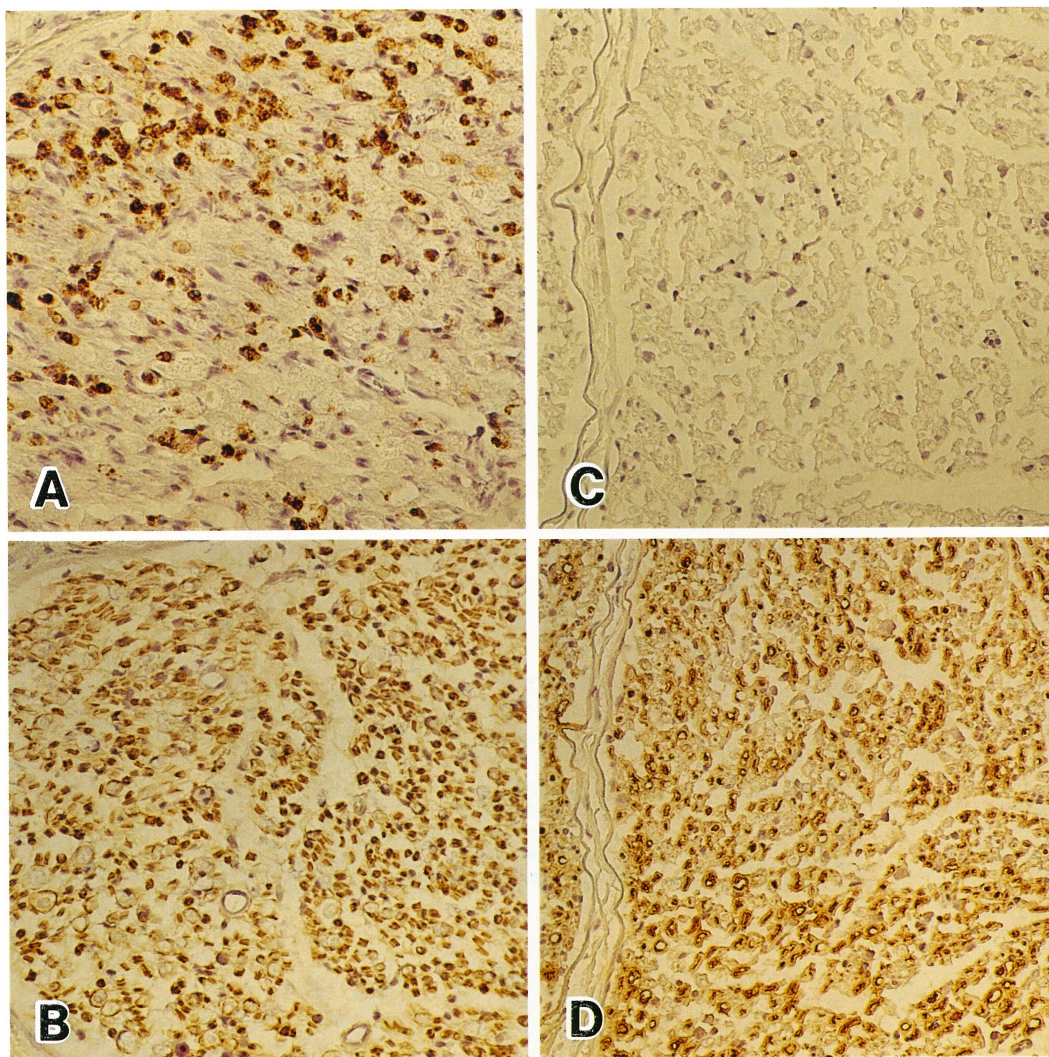


Fig. 4. Immunohistochemical localization of ED-1 and SMI 31. A. At three days after transection, several ED-1 positive cells have infiltrated into the injured lesion. $\times 220$. B. In the adjacent transverse section to A, SMI 31 is negative in the some axons. $\times 220$. C. At the same time, in the portion distal to the transection injury, ED-1 is negative. $\times 220$. D. In the adjacent transverse section to C, SMI 31 is negative in some axons. $\times 220$.

免疫組織化学的所見

障害を加えていない左坐骨神経には経過中、ED-1 陽性細胞はみられなかった。

切断障害：3 日目障害部では ED-1 陽性細胞が認められた (Fig. 4A)。それより末梢側では ED-1 陽性細胞は認められなかった (Fig. 4C)。SMI 31 は、障害部 (Fig. 4B)、末梢側 (Fig. 4D) とも軸索の一部で染色性が低下した。切断後 5 日目、障害部より末梢側で ED-1 陽性

細胞が出現し、以後、数、大きさとも増加し、14 日目ピークに達した。以後、ED-1 陽性細胞の数は減少し、28 日目少数が認められるのみとなった。切断障害では、近位部、遠位部での ED-1 陽性細胞の数に差はみられなかった。

圧迫挫滅障害：5 日目 ED-1 陽性細胞が出現し、14 日目ピークに達し、28 日目には小数になる傾向は切断障害と同様であったが、5 日目より ED-1 陽性細胞の数が圧迫挫滅障害の近位部

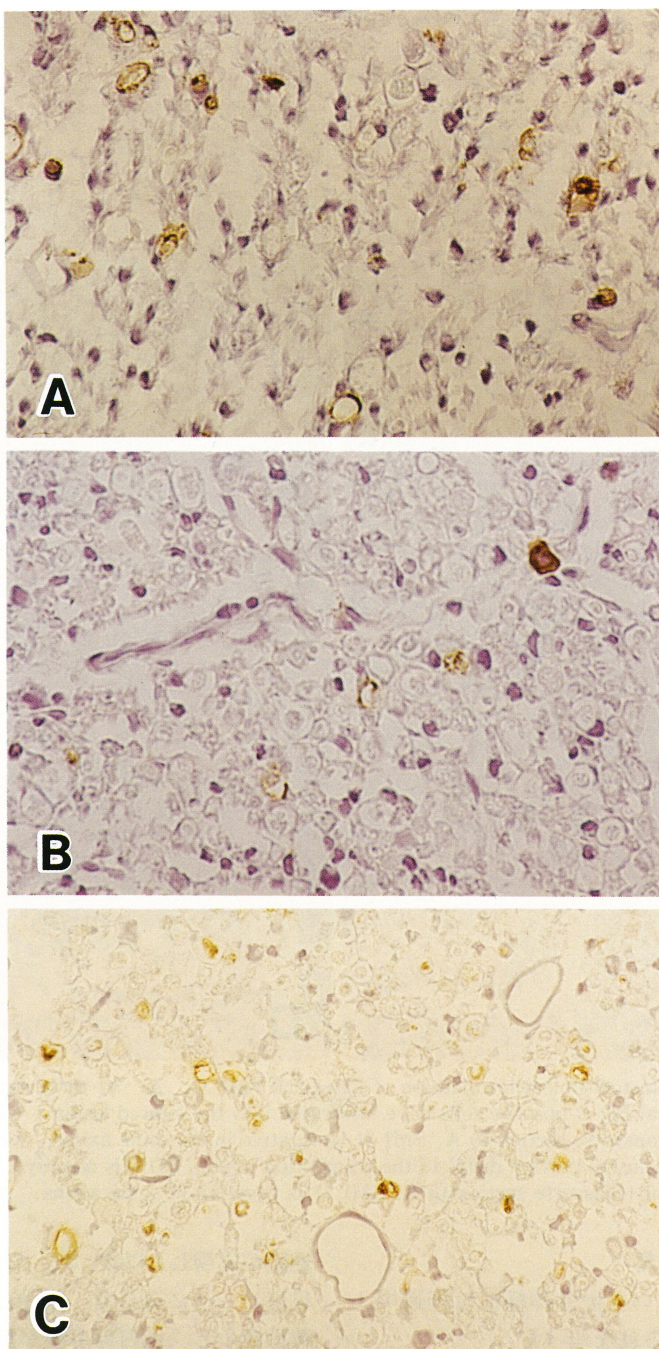


Fig. 5. Immunohistochemical localization of ED-1 positive cells in the rat sciatic nerve at five days after axotomy.
A. The portion distal to the transection injury. $\times 400$.
B. The portion distally near to the crush injury. $\times 400$.
C. The portion distally far from the crush injury. $\times 400$.
There were fewer ED-1 positive cells in the portion distally near to the crush injury than in the other portions.

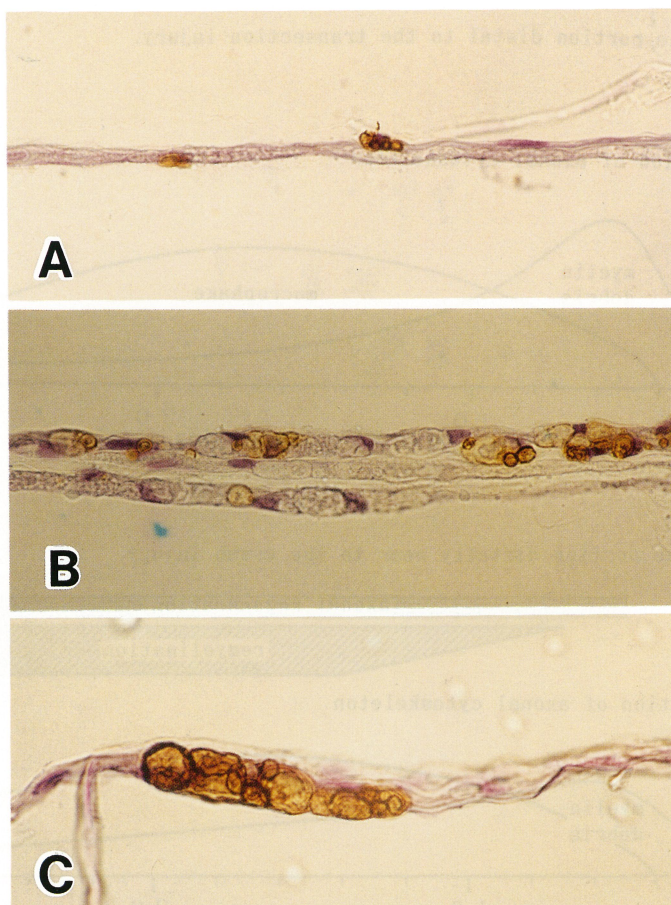


Fig. 6. Teasing nerves after immunohistochemical staining with ED-1. A. At five days after transection, an ED-1 positive cell adheres to the nerve fibers. $\times 180$. B. At seven days after transection, some ED-1 positive cells have infiltrated into the nerve fiber. $\times 220$. C. At 14 days after crushing, large ED-1 positive cells are seen in a row. $\times 285$.

(Fig. 5B) は、同障害の遠位部 (Fig. 5C) や切断障害の近位部 (Fig. 5A), 遠位部に比較して少なかった。崩壊髄鞘の量と同様、14日目までこの傾向が持続した。

ときほぐし標本では切断後5日目神経線維周囲に小型の ED-1 陽性細胞が付着していた (Fig. 6A)。7日目神経線維の内に侵入した ED-1 陽性細胞が認められた (Fig. 6B)。圧迫挫滅後14日目大型の陽性細胞が、神経線維に沿って連なって存在するのが観察された (Fig. 6C)。

経過を各部位で比較する (Fig. 7) と、各部

位とも障害後2日目既存の軸索の細胞骨格が崩壊し、既存の髄鞘の崩壊も開始された。5日目から7日目に崩壊髄鞘は量的にピークに達した。macrophage は障害5日目で明かとなり、14日目数、大きさともピークに達した。圧迫挫滅障害では近位部では5日目に、遠位部では9日目再生軸索の一部が到達していた。経過中、崩壊髄鞘の量、macrophage の数とも圧迫挫滅の近位部は他の部位に比較して少なかった。

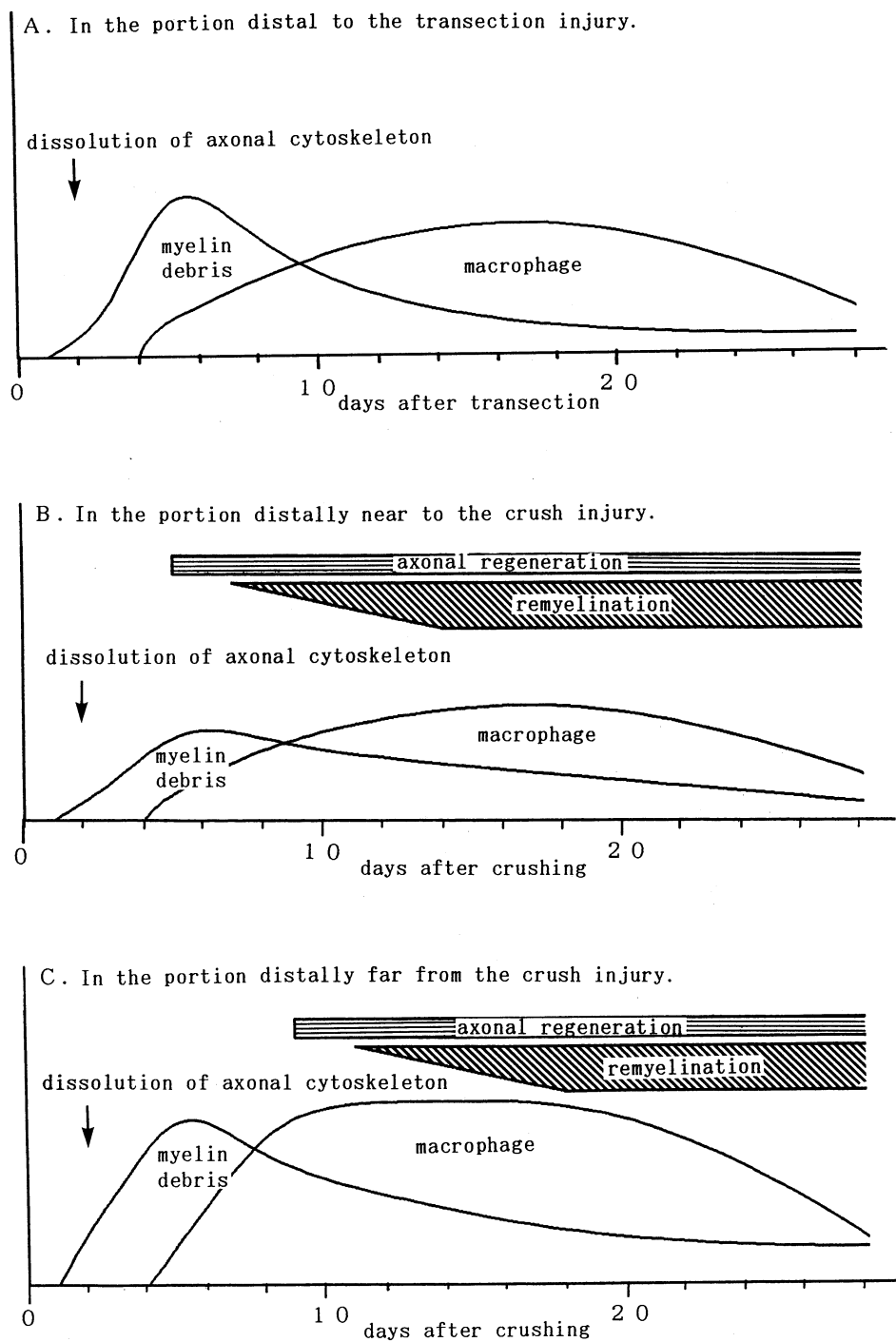


Fig. 7. The time course of the changes in the amount of myelin debris and the number of macrophages. A. In the portion distal to the transection injury. B. In the portion distally near to the crush injury. C. In the portion distally far from the crush injury.

考 察

末梢神経に障害が加わると、障害部より末梢側は Waller 変性に陥り、軸索および、それを取り囲む髄鞘が崩壊する。末梢神経が中枢神経に比較して再生能力に優れるのはこの Waller 変性が速やかに行われ、再生軸索を待ち受ける環境が整うのが一つの要因であると考えられている²⁾。Beuche と Friede³⁾ は milli-pore chamber を用いた末梢神経の組織培養において macrophage の浸潤がなければ、髄鞘の崩壊はみられないという macrophage の役割を重要視する実験結果を報告した。以来、Waller 変性の主役が macrophage であるのか、Schwann 細胞であるのかが注目されている。

前回、*in vivo* では Waller 変性および再生過程において Schwann 細胞が単独で髄鞘の消化、吸収を開始することを明らかにした¹⁾が、今回、免疫組織化学的に macrophage を同定し、両者の役割を検討した。

前回報告した通り切断障害、圧迫挫滅障害とも障害を加えて2日目に電顕的に軸索崩壊が観察された。同時に Schwann 細胞は既存の髄鞘の消化を開始し、endoneurium には細い突起と桿状の核を持った未熟な細胞が認められた。免疫組織化学的にこの時点では ED-1 で陽性となる細胞は認められなかった。3日目以降、Schwann 細胞の中で既存の髄鞘の崩壊が進行していった。5日目初めて ED-1 陽性細胞が出現した。電顕的にも lysosome に富み、成熟した monocyte⁴⁾ に一致する細胞が認められた。ときほぐし標本では既存の髄鞘が短縮しつつある神経線維に付着する ED-1 陽性細胞がみられた。7日目ときほぐし標本で神経線維内に侵入した ED-1 陽性細胞が認められた。9日目電顕的に基底膜の外に放出された髄鞘の崩壊産物を取り囲む macrophage 様細胞が観察された。

以上から、*in vivo* では Waller 変性の初期には Schwann 細胞のみで髄鞘の消化、吸収を開始し、Schwann 細胞のみで吸収しきれない髄鞘の

崩壊産物の除去を macrophage が担っていることが示唆された。

障害後5日目から14日目にかけて圧迫挫滅障害の近位部では圧迫挫滅障害の遠位部や切断障害の近位部、遠位部に比較して崩壊髄鞘の量、macrophage の数とも少ない傾向がみられた。圧迫挫滅後5日目近位部で再生軸索が認められた。14日目遠位部にかなりの数の再生軸索が到達した。すなわち、軸索再生のある圧迫挫滅障害の近位部では、軸索再生の遅い圧迫挫滅障害の遠位部、軸索再生のない切断障害の近位部、遠位部に比較して経過を通じて崩壊髄鞘の量が少なく、崩壊髄鞘の吸収が速やかに進行していた。また、同部では ED-1 陽性細胞の数も少ないことから、その主体となっているのは monocyte/macrophage 系の細胞ではなく、Schwann 細胞であることが示唆され、軸索再生のある部位では、Schwann 細胞による髄鞘の消化、吸収能力が高まるのではないかと推測された。切断障害と圧迫挫滅障害では Waller 変性に伴う既存の軸索、髄鞘の崩壊開始には差がなかったが、その後の崩壊産物の吸収過程に差がみられた。

macrophage が放出する interleukin-1 が Schwann 細胞の神経成長因子の産生を促すことが報告されている^{5), 6)}。また、Schwann 細胞は神経成長因子を NGFR を介して再生軸索に供給し再生能力を促すと想定されている^{1), 7)}。

末梢神経系において Waller 変性が速やかに進行し、軸索再生が可能となるには、再生軸索、Schwann 細胞、macrophage が様々のサイトカインを介して密に情報交換を行っている結果と考えられた。

障害2日目 ED-1 で陽性とならない未熟な細胞が電顕的に認められた。末梢神経にも、他の臓器と同様、固有在在 macrophage が存在するといわれている^{8), 9)}が、今回、用いた ED-1 では障害を加えていないコントロールの坐骨神経には陽性細胞が認められなかった。ED-1 で認識される細胞は骨髄由来の macrophage^{9), 10)} が主体であり、今後は在在 macrophage の役割について検討を加える必要がある。

本論文の概要は、第34回日本神経学会総会（1993年6月9日、千葉）にて発表した。ご指導いただいた川崎医科大学神経病学教室 調 輝男教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 森定ゆみ：末梢神経の変性および再生過程における低親和性神経成長因子受容体 (low affinity nerve growth factor receptor) の発現. 川崎医学会誌 19 : 155—167, 1993
- 2) Perry VH, Brown MC, Gordon S : The macrophage response to central and peripheral nerve injury. J Exp Med 165 : 1218—1223, 1987
- 3) Beuche W, Friede RL : The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. J Neurocytol 13 : 767—796, 1984
- 4) Cline MJ : The mononuclear phagocyte system. Monocyte and macrophage. In Atlas of Blood Cells. Function and Pathology. Vol. 1, ed. by Zucker-Franklin, Greaves MF, Grossi CE, and Marmont AM. Milano, Edi. Ermes s. r. l. Philadelphia, Lea and Febiger. 1981, pp. 319—343
- 5) Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, Shooter E, Thoenen H : Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration : Role of macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 8735—8739, 1987
- 6) Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H : Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. Nature 330 : 658—659, 1987
- 7) Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB, Johnson EM Jr : Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves : Ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. J Neurosci 8 : 664—681, 1988
- 8) Oldfors A : Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. Acta Neuropathol (Berl) 49 : 43—49, 1980
- 9) Monaco S, Gehrmann J, Raivich G, Kreutzberg GW : MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. J Neurocytol 12 : 623—634, 1992
- 10) Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G : The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs : distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. Immunology 54 : 589—599, 1985